



北海道公立大学法人  
**札幌医科大学**  
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	Umbilical cord extracts improve osteoporotic abnormalities of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and promote their therapeutic effects on ovariectomized rats (臍帯抽出物は骨粗鬆症に伴う骨髄間葉系幹細胞の異常性を改善し、卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットに対する細胞治療の効果を改善する)
Author(s) 著 者	齋藤, 憲
Degree number 学位記番号	甲第 2967 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2017-03-31
Original Article 原著論文	札幌医学雑誌第 86 巻 1 号 (平成 30 年 3 月)
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

## 学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 2967 号	氏 名	齋藤 憲
<p><u>論文題名</u></p> <p>Umbilical cord extracts improve osteoporotic abnormalities of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and promote their therapeutic effects on ovariectomized rats</p>			
<p><u>研究目的</u></p> <p>近年の高齢化社会において骨粗鬆症は根本的な対策が必要な疾患の一つと考えられている。我々はその中でも閉経後女性におこるエストロゲン低下により生じる閉経後骨粗鬆症に着目した。近年、安全性の課題および倫理的ハードルが低い自家細胞移植の最適な細胞源として骨髄由来間葉系幹細胞(Bone marrow derived Mesenchymal stem cell, BM-MSCs)を用いた細胞治療の臨床応用が進んでおり、骨粗鬆症治療においても注目されている。しかし、骨粗鬆症患者における BM-MSCs の異常性が指摘されており、自家細胞移植には適切でない可能性がある。</p> <p>そこで、本研究では、まず卵巣摘出手術(ovariectomy, OVX)を行った閉経後骨粗鬆症モデルラット(OVX rat)由来 BM-MSCs (OVX-MSCs)の異常性と OVX rat に対する OVX-MSCs の細胞治療効果を明らかにする。次に賦活剤として見出した、臍帯組織由来抽出物(Wharton's jelly extracts supernatant, WJS)の OVX-MSCs 賦活化効果を明らかにする。さらに、WJS で賦活化した OVX-MSCs (OVX-MSCs-WJ(+))の OVX rat への細胞治療効果を検討する。これらの結果から、賦活化された機能的 BM-MSCs による自家細胞移植が骨粗鬆症に対する新しい治療法として有効かどうかを明らかにすることを、本研究の目的とする。</p>			
<p><u>研究方法</u></p> <p>8 週齢メス Wister ラットを用いた OVX rat (OVX 群)と、偽手術を行った対照群(Sham 群)を作成した。手術後 4, 8, 12 週に、血清 TRACP 活性、<math>\mu</math>CT による脛骨骨組織の骨構造解析、骨組織の形態解析、免疫組織化学染色による receptor activator of nuclear factor-<math>\kappa</math>B (RANK)、tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP)の発現を評価した。</p> <p>各モデルラットの大腿骨から骨髄液を採取し、接着培養にて BM-MSCs を採取した。BM-MSCs は、細胞形態、表面抗原、細胞増殖能 (PDT、MTT assay)、骨芽細胞・脂肪細胞への分化能、骨分化関連因子・破骨細胞制御因子の発現を評価した。さらに、OVX rat に対する OVX-MSCs の治療効果を検討した。Vehicle、Sham-MSCs、OVX-MSCs を OVX 術後 4 週に尾静脈から経静脈投与し、投与 8 週後に治療効果を評価した。</p>			

次に、OVX-MSCs の賦活化法を検討した。賦活剤として、臍帯組織抽出液 ‘WJS’ を作製し、OVX-MSCs の賦活剤として、その効果を解析した。 *In vitro* における WJS 添加 OVX-MSCs (OVX-MSC-WJ(+)) の細胞賦活化効果、および *in vivo* における OVX rat に対する OVX-MSC-WJ(+) の治療効果を検討した。

さらに、各 BM-MSCs の破骨細胞に対する作用を解析した。RAW274.6cell を RANK ligand (RANKL) および MEK 阻害剤である PD98059 で刺激してマクロファージ由来誘導破骨細胞を分化誘導した。続いてこの誘導破骨細胞を各々 Vehicle、Sham-MSCs、OVX-MSCs-WJ(-)、OVX-MSCs-WJ(+) とトランスウエルを用いて共培養し、破骨細胞の形態、分化・活性化・融合関連因子の発現、破骨細胞培養上清の TRACP 活性を解析した。

### 研究成績

OVX による閉経後骨粗鬆症モデルの病態を評価した。OVX 群では、 $\mu$ CT および骨組織標本にて OVX 術後 4 週より脛骨近位の骨密度・骨梁数の減少と骨梁間隙の拡大を認め、OVX 術後 12 週より骨梁幅の減少を認めた。また、OVX 群の骨組織にて、破骨細胞の RANK と TRACP の発現増加と、TRACP 陽性破骨細胞数の増加も認めた。血清 TRACP 活性の増加を認めた。

OVX-MSCs の異常性を評価した。OVX-MSCs は、細胞の平坦化と細胞突起の短縮化、ストレスファイバーの増加による細胞面積拡大を認め、細胞の配向性の乱れも認めた。PDT、MTT assay にて増殖能の低下を認めた。また骨分化関連因子(*Runx2*, *Ocn*, *Era*)・破骨細胞制御因子 (*Opg*) の発現低下を認めた。分化誘導にて骨芽分化能の低下と脂肪分化能の亢進を認めた。

OVX rat に対する BM-MSCs の治療効果を解析した。Vehicle 投与群と比較し、Sham-MSCs 投与群では、 $\mu$ CT および骨組織標本にて脛骨近位の骨密度、骨梁幅、骨梁数の増加と骨梁間隙の縮小を認めた。Sham-MSCs 投与群の骨組織にて、破骨細胞の RANK と TRACP の発現抑制と、TRACP 陽性破骨細胞サイズの縮小を認めた。血清 TRACP 活性の低下を認めた。一方、OVX-MSCs 投与群は、Vehicle 投与群と類似の変化を認めた。

WJS の OVX-MSCs に対する賦活化効果を解析した。WJS を添加培養した OVX-MSCs-WJ(+) は、細胞突起が細く長くなり、細胞面積の縮小と紡錘形への変化を認め、配向性の改善も認めた。PDT、MTT assay にて増殖能の改善を認めた。骨分化関連因子 *Ocn* の発現がさらに低下し、分化誘導にて骨分化能の低下を認めたが、脂肪分化能は変化しなかった。

OVX rat に対する OVX-MSCs-WJ(+) の治療効果を解析した。OVX-MSCs-WJ(+) 投与群では、Vehicle 治療群と比較して  $\mu$ CT および骨組織標本にて脛骨近位の骨密度、骨梁幅の増加を認めた。骨組織にて、破骨細胞の RANK と TRACP の発現抑制と破骨細胞サイズの縮小を認めた。また、血清 TRACP 活性の低下を認めた。

さらに、BM-MSCs の破骨細胞に対する制御作用を *in vitro* で解析した。マクロファージ

由来誘導破骨細胞を Sham-MSCs や OVX-MSCs-WJ(+)と共培養すると、破骨細胞の小型化、破骨細胞分化関連因子(*c-fms*、*Nfatc1*)・骨融解活性化関連因子(*Cath-k*、*Cle7*、*Atp6i*)・破骨細胞癒合関連因子(*Dc-stamp*)の発現抑制、培養上清の TRACP 活性の抑制を認めた。一方で OVX-MSCs-WJ(-)との共培養では、これらの制御効果は減弱していた。

### 考察

OVX rat から単離された BM-MSCs (OVX-MSCs) は形態学的・機能的異常を有していた。BM-MSCs の細胞サイズは、幹細胞の増殖能、分化能、組織再生能などに関連していると報告されており、本研究においても OVX-MSCs における形態異常が機能障害と関連していると考えられた。また、骨分化能や破骨細胞制御能が低下していたことから、内在性の OVX-MSCs の異常性が OVX rat の骨密度低下を引き起こすのみでなく、OVX-MSCs による細胞治療効果の消失にも関係していると推測された。実際、正常ラット由来の BM-MSCs (Sham-MSCs) による細胞治療では、骨粗鬆症抑制効果が見られたのに対し、OVX-MSCs による細胞治療では治療効果が低下していた。

我々が細胞賦活剤として開発した臍帯組織抽出液(WJS)は、OVX-MSCs の異常性を改善した。WJS の添加により、OVX-MSCs の形態学的異常、および増殖能が改善された。細胞増殖能の改善は、細胞療法において短時間に十分な数の細胞を確保するために有益である。一方で、WJS は OVX-MSCs の骨分化能をさらに抑制した。臍帯由来 MSCs (UC-MSCs) は Runx2 と Twist2 の発現が低下し、骨分化が低下していることが報告されており、分化能において OVX-MSCs-WJ(+)は UC-MSCs と類似の特徴を示したと考えられた。

WJS は insulin-like growth factor I (IGF-I)、basic fibroblast growth factor (b-FGF)、transforming growth factor  $\beta$ (TGF- $\beta$ )、platelet-derived growth factor (PDGF)などの様々な細胞活性因子を含有し、これらは BM-MSCs に対して増殖促進効果やアポトーシス抑制効果をもつことが報告されている。WJS は多彩な細胞賦活化因子を含むため、OVX-MSCs の増殖能を強力に改善したと考えられた。

OVX-MSCs-WJ(+)による細胞治療では、骨粗鬆症が改善した。OVX-MSCs-WJ(+)群で骨組織における RANK 発現が低下しており、OVX-MSCs-WJ(+)は破骨細胞の骨吸収活性を制御する RANKL/RANK/OPG システムに作用したと考えられた。RANK の細胞内シグナルは IL-1・IL-6・TNF- $\alpha$  などの単球関連サイトカインにより活性化される。一方、OVX-MSC-WJ(+)が UC-MSCs と類似の特性を示し、UC-MSCs は単球関連サイトカイン産生抑制効果をもつことから、OVX-MSC-WJ(+)は RANK シグナルを抑制し、破骨細胞活性を抑制したと考えられた。これらの知見は、*in vivo* で OVX-MSCs-WJ(+)群の TRACP 陽性破骨細胞数が減少していたことと相関していた。一方、WJS により OVX-MSCs の骨分化能は低下したが、我々の Sham-MSCs による検討や過去の報告においても、経静脈的に投与した BM-MSCs の骨組織への局在は非常に少ないことから、投与した BM-MSCs の有効性機序は骨分化能には依存しないと考えられた。

BM-MSCs による直接的な破骨細胞活性制御能を *in vitro* で検討した。OVX-MSCs-WJ(+)は、Sham-MSCs と同様にマクロファージ誘導破骨細胞の融合および拡大を抑制し、破骨細胞分化因子・骨融解活性化因子・破骨細胞癒合関連因子の発現を抑制し、培養上清の TRACP 活性を抑制した一方で培養上清中の TRACP レベルと破骨細胞の破骨細胞活性化因子発現も、抑制された。OVX-MSCs-WJ(+)の破骨細胞制御因子 *Opg* の発現は Sham-MSCs よりも低かったことから、Sham-MSCs および OVX-MSCs-WJ(+)は、破骨細胞活性および成熟を、異なるメカニズムによって制御したものと考えられた。

### 結論

OVX rat 由来の BM-MSCs (OVX-MSCs) は異常化しており、骨粗鬆症に対する細胞の効果が低下していた。OVX-MSCs の異常性を改善させるために臍帯組織抽出液(WJS)を用いた新規賦活化法を開発した。WJS は *in vitro* で OVX-MSCs の形態学的、機能的異常を改善し、また *in vivo* で OVX rat に対する OVX-MSCs の治療効果を改善した。本研究は、WJS の骨粗鬆症に起因する BM-MSCs の異常性改善における有効性を示した最初の研究である。この方法は、閉経後骨粗鬆症のみならず、他の原因による骨粗鬆症で自家 BM-MSCs が異常化した患者においても、効果が期待される。

## 論文審査の要旨及び担当者

(平成 29 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 2967 号	氏 名	齋藤 憲
論文審査 担 当 者	主査 教授 山下敏彦	副査 教授 藤宮峯子	
	委員 教授 本望修	委員 教授 石合純夫	

論文題名	Umbilical cord extracts improve osteoporotic abnormalities of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and promote their therapeutic effects on ovariectomized rats 臍帯抽出物は骨粗鬆症に伴う骨髄間葉系幹細胞の異常性を改善し卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットに対する細胞治療の効果を改善する
結果の要旨 <p>閉経後骨粗鬆症由来 BM-MSCs (OVX-MSCs) の異常性を明らかにし、さらに細胞賦活剤で賦活化した BM-MSCs が骨粗鬆症に対して治療効果を回復することを明らかにした。本研究で検証した細胞賦活剤は、OVX-MSCs の破骨細胞制御能と細胞増殖能を改善し、自家移植における細胞治療の高い有効性と安定的な細胞数の確保を実現化することが示唆された。本論文は、BM-MSCs を用いた骨粗鬆症治療の臨床応用を実現化する上で解決すべき重要な課題を克服する方法を検証したものであり、審査の結果、博士（医学）の学位授与に値すると認められた。</p>	